

• 药理与临床 •

下调 PGI/AMF 基因协同人参皂苷 Rh₂ 对白血病 KG1 α 细胞作用的体外研究

游智梅, 陈地龙, 赵 亮, 魏 强, 夏 菁, 李丹阳, 李 静*

重庆医科大学 组织学与胚胎学教研室, 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

摘要: **目的** 通过干扰 RNA 的方法下调人磷酸葡萄糖异构酶/自分泌因子 (PGI/AMF) 基因的表达, 研究人 PGI/AMF 基因协同人参皂苷 Rh₂ 对白血病 KG1 α 细胞的影响。**方法** 将对数生长期 KG1 α 细胞及转染细胞分成对照组和用药组, 对照组常规培养, 药物组细胞培养体系中分别加入 30、45、60、75、90 $\mu\text{mol/L}$ 的人参皂苷 Rh₂, 各组分别培养 24、48、72 h 后, CCK-8 检测人参皂苷 Rh₂ 对白血病 KG1 α 及转染细胞增殖的影响; 台盼蓝检测人 PGI 基因对 KG1 α 细胞增殖的影响; Antibody Array 检测人参皂苷 Rh₂ 对 Akt 通路蛋白的影响; Western blotting 检测下调 PGI/AMF 与 人参皂苷 Rh₂ 在 mTOR、Raptor、Rag 蛋白表达变化方面的相关性。**结果** 人参皂苷 Rh₂ 抑制 KG1 α 的增殖; 下调 PGI/AMF 使 KG1 α 对 人参皂苷 Rh₂ 更加敏感; 下调 PGI 基因抑制细胞增殖; Antibody Array 结果显示人参皂苷 Rh₂ 通过下调 P38、mTOR、Akt、AMPK α 、PARP、Bad 的表达影响 KG1 α 增殖; Western blotting 结果显示下调 PGI 基因通过抑制 mTOR、Rag、Raptor 表达与 人参皂苷 Rh₂ 产生协同作用调节人白血病细胞增殖。**结论** 下调 PGI 基因协同人参皂苷 Rh₂ 抑制 KG1 α 细胞的增殖。

关键词: 人参皂苷 Rh₂; 白血病 KG1 α 细胞; 细胞增殖; 磷酸葡萄糖异构酶/自分泌因子; mTOR

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)07-0960-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.07.012

Effect of down-regulation of phosphoglucose isomerase / autocrine motility factor gene with ginsenoside Rh₂ on leukemia KG1 α cells *in vitro*

YOU Zhi-mei, CHEN Di-long, ZHAO Liang, WEI Qiang, XIA Jing, LI Dan-yang, LI Jing

Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the down-regulation of phosphoglucose isomerase / autocrine motility factor (PGI/AMF) gene expression by interfering RNA for study on the pharmacological effect of PGI/AMF with ginsenoside Rh₂ on leukemia KG1 α cells. **Methods** The KG1 α and the silencing PGI/AMF α KG1 α (siPGI-KG1 α) cells at logarithmic growth phase were divided into control and drug groups in different dosages. The cells in the control group were normally treated and the cells in the drug groups were incubated with ginsenoside Rh₂ in the concentration of 30, 45, 60, 75, and 90 $\mu\text{mol/L}$ in 24, 48, and 72 h respectively. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to demonstrate the effect of ginsenoside Rh₂ on proliferation of KG1 α and siPGI-KG1 α cells. Trypan blue staining was applied to detecting the effect of human PGI on the proliferation of leukemia KG1 α cell. The changes of KG1 α by ginsenoside Rh₂ on Akt pathway were tested by Antibody Array. The correlation of down-regulating PGI/AMF and Rh₂ about mTOR, Raptor, and Rag was detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, ginsenoside Rh₂ had significant inhibition on the proliferation of KG1 α . Down-regulation of PGI/AMF could make KG1 α more sensitive to ginsenoside Rh₂ and down-regulation of PGI could inhibit the proliferation of KG1 α . Antibody Array showed that ginsenoside Rh₂ could inhibit the proliferation of KG1 α cells through decreasing the expression of P38, mTOR, Akt, AMPK α , PARP, and Bad. Western blotting results indicated that down-regulation of PGI through the synergy of mTOR, Rag, and Raptor with ginsenoside Rh₂ could inhibit the proliferation of KG1 α cells. **Conclusion** Down-regulation of PGI/AMF coordinated with ginsenoside Rh₂ could inhibit the proliferation of KG1 α cells.

Key words: ginsenoside Rh₂; leukemia KG1 α cells; cell proliferation; phosphoglucose isomerase / autocrine motility factor; mTOR

收稿日期: 2013-09-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31271368); 重庆市教委基金项目 (KJ110328)

作者简介: 游智梅 (1987—), 女, 四川自贡人, 硕士研究生, 主要从事中药调控血液肿瘤的相关信号通路研究。

Tel: 15178784725 E-mail: yujimi.shi@163.com

*通信作者 李 静 E-mail: lijingyangyang@126.com

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 作为传统中药,在现代肿瘤治疗中发挥重要作用,关于人参抗肿瘤作用的具体机制是亟待研究的课题。磷酸葡萄糖异构酶(phosphoglucose isomerase, PGI)在细胞中广泛存在,在细胞内作为糖酵解途径的酶,同时在细胞外作为自分泌因子(autoocrine motility factor, AMF)参与肿瘤的生长、转移、浸润^[1-2]。人参皂苷 Rh₂ 为人参代表性有效成分之一,在体内、外起着重要的抗癌效果^[3-5],但是其相关机制不完善。本研究探讨人参皂苷 Rh₂ 与肿瘤密切相关的人 PGI/AMF 基因之间的关系,来进一步揭示人参皂苷 Rh₂ 的抗癌机制。本实验通过干扰 RNA 的方法下调 PGI/AMF 基因,探讨人参皂苷 Rh₂ 对细胞增殖的影响,以及对 PGI 涉及的 Akt-mTOR 通路相关蛋白的表达变化进行研究,旨在阐述人参皂苷 Rh₂ 抑制白血病细胞增殖及促凋亡的相关机制,为开发治疗白血病的天然药物提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

人参皂苷 Rh₂, 购于国家标准物质网,属北京世纪奥科生物技术有限公司,质量分数≥98%(HPLC),批号 MUST-11091602,规格为 20 mg/瓶。用二甲基亚砜(DMSO)溶解(DMSO 终体积分数不超过 0.1%),高浓度保存,实验时用培养基稀释。RPMI 1640 培养基, Hyclone 公司; 6 孔板, NEST 公司; CCK-8 试剂盒, 日本同仁研究所; 细胞凋亡 Hoechst 染色试剂盒, 碧云天生物技术研究; 兔抗人雷帕霉素靶点(mTOR)、Raptor、Rag、PathScan® Akt Signaling Antibody Array Kit, CST 公司; PGI ELISA Assay Kit, Cusabio 公司; ECL 发光试剂盒, Millipore 公司。

1.2 人白血病 KG1α 细胞株

本实验室保存,在含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液中常规培养,每 2~3 天传代。

1.3 仪器

CO₂ 细胞培养箱, 美国 Forma Scientific 公司; 正置荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; Bio-Rad M450 酶标测定仪、化学发光成像系统, 美国 Bio-Rad; FACSscan 型流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

KG1α 细胞以 $7 \times 10^8/L$ 接种于含 10%小牛血清

的 RPMI 1640 培养液中,转染下调 PGI 细胞(siPGI-KG1α)、转染空质粒细胞接种在含嘌呤霉素(0.5 μg/mL)的 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养基中,在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度下常规培养,每 2~3 天传代 1 次。

2.2 CCK-8 法检测细胞毒性

将细胞以 $2 \times 10^5/mL$ 的密度接种于培养基中,分成对照组和给药组,在生长对数期时加入终浓度为 30、45、60、75、90 μmol/L 的人参皂苷 Rh₂, 分别诱导培养 24、48、72 h 后,每孔加入 CCK-8 液体 20 μL, 37 °C 培养 4 h, 酶标仪测 450 nm 处吸光度(A)值,以对照组作为 100%, 计算各组细胞增殖抑制率。

2.3 台盼蓝染色

正常 KG1α 组、siPGI-KG1α 组、空质粒组 3 组细胞分别以 $3 \times 10^4/mL$ 的密度接种于 6 孔板中,每天设 3 个复孔,常规培养。每天用 0.4%台盼蓝染色计数,分别计数 8 d,最后进行统计。

2.4 Annexin-V 染色法检测细胞凋亡

将正常 KG1α 细胞、siPGI-KG1α 细胞以 $2 \times 10^6/mL$ 的密度分别接种于相应培养基中培养 24 h,加入人参皂苷 Rh₂, 其终浓度为 75 μmol/L, 培养 48 h 后收集细胞样品于 1.5 mL 离心管内, PBS 洗涤 2 次,收集 2×10^5 细胞,加入 500 μL 的结合缓冲液重悬细胞,加入 5 μL 的 Annexin-V 混匀后再加入 5 μL 碘化丙啶(PI)混匀,室温避光反应 10 min,用流式细胞仪检测分析。

2.5 Antibody array 分析

正常 KG1α 细胞以 $2 \times 10^6/mL$ 的密度接种于培养基中,24 h 后分成对照组和给药组,给药组加入人参皂苷 Rh₂, 使其终浓度为 75 μmol/L, 培养 48 h 后收集细胞样品,提取蛋白,按照试剂盒说明书步骤进行操作,通过化学发光法检测。

2.6 Western blotting 检测

正常 KG1α 细胞和 siPGI-KG1α 细胞以 $2 \times 10^6/mL$ 的密度接种于培养基中,加入人参皂苷 Rh₂, 其终浓度为 75 μmol/L, 诱导 48 h, 根据 Antibody Array 分析结果检测人参皂苷 Rh₂ 处理 48 h 后 mTOR、Raptor、Rag 蛋白的表达变化。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件对所得数据进行统计处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 人参皂苷 Rh₂ 抑制正常 KG1 α 及 siPGI-KG1 α 细胞的增殖

人参皂苷 Rh₂ 诱导正常 KG1 α 及 siPGI-KG1 α 细胞, CCK-8 结果显示人参皂苷 Rh₂ 对正常 KG1 α 及 siPGI-KG1 α 细胞有明显的抑制作用。30 $\mu\text{mol/L}$ 的人参皂苷 Rh₂ 作用 48 h 后对 siPGI-KG1 α 细胞的抑制率为 28.1%, 对正常 KG1 α 细胞的抑制率为 19.6%。同浓度人参皂苷 Rh₂ 作用下, siPGI-KG1 α 细胞的敏感性增强, 抑制率更高, 同时随着作用时间的增加, 其抑制率呈递增趋势。见图 1。

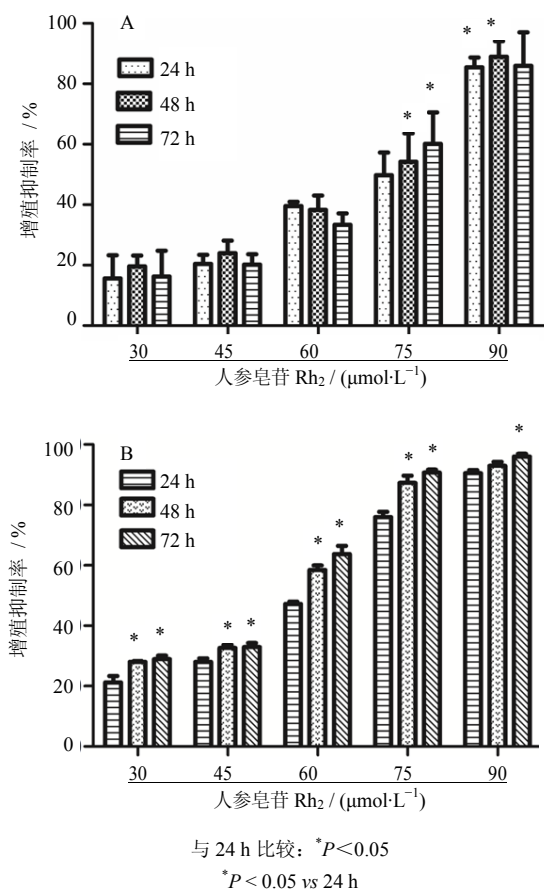


图1 人参皂苷 Rh₂ 对 KG1 α (A) 及转染株 siPGI-KG1 α (B) 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of ginsenoside Rh₂ on proliferation of KG1 α (A) and siPGI-KG1 α cells (B) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 下调 PGI 基因抑制 KG1 α 增殖并促进其凋亡

为检测下调 PGI 后对 KG1 α 增殖的影响, 用台盼蓝染色方法比较正常 KG1 α 组、空质粒转染组、siPGI-KG1 α 组的细胞增殖情况, 结果显示下调 PGI 基因后 KG1 α 的生长受到抑制, 尤其是在后期 6~8 d, 结果见图 2。同时检测下调 PGI 基因

对人参皂苷 Rh₂ 促进 KG1 α 凋亡的影响, 通过流式细胞仪检测发现, 下调 PGI 基因之后 KG1 α 对人参皂苷 Rh₂ 更加的敏感, 同浓度组更易发生凋亡, 结果见图 3。

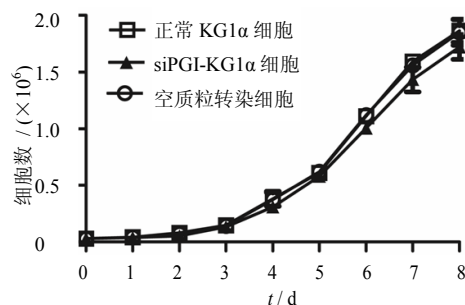


图2 下调 PGI/AMF 对 KG1 α 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of down-regulation of PGI/AMF on proliferation of KG1 α cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

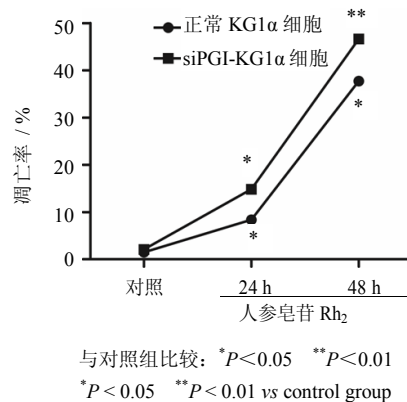


图3 人参皂苷 Rh₂ 对 KG1 α 和 siPGI-KG1 α 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of ginsenoside Rh₂ on apoptosis of KG1 α and siPGI-KG1 α cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 下调 PGI 基因通过 mTOR 途径协同人参皂苷 Rh₂ 作用于 KG1 α

运用 Antibody Array 方法检测人参皂苷 Rh₂ 对 KG1 α 细胞 Akt 通路蛋白表达的影响, 结果显示人参皂苷 Rh₂ 可影响通路中 P38、mTOR、Akt、AMPK α 、PARP、Bad 蛋白的表达, 使其表达均降低, 结果见图 4。Western blotting 结果显示, 在下调 PGI 基因之后, PGI 及 mTOR 通路的 mTOR、Rag、Raptor 的表达均有一定程度下降, 同时人参皂苷 Rh₂ 作用下, 其表达程度呈现明显下调, 进一步表明下调 PGI 基因可以协同人参皂苷 Rh₂ 作用于 KG1 α 细胞, 这可能是通过 Akt/mTOR 通路实现的。结果见图 5。

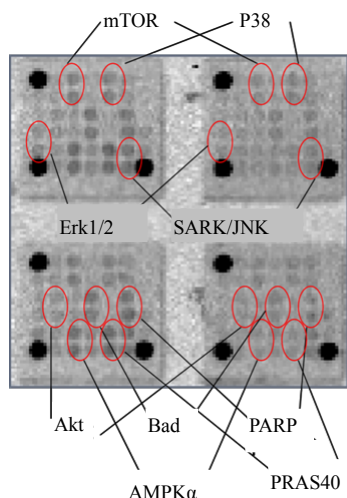


图4 Antibody array 分析结果
Fig. 4 Results of antibody array analysis

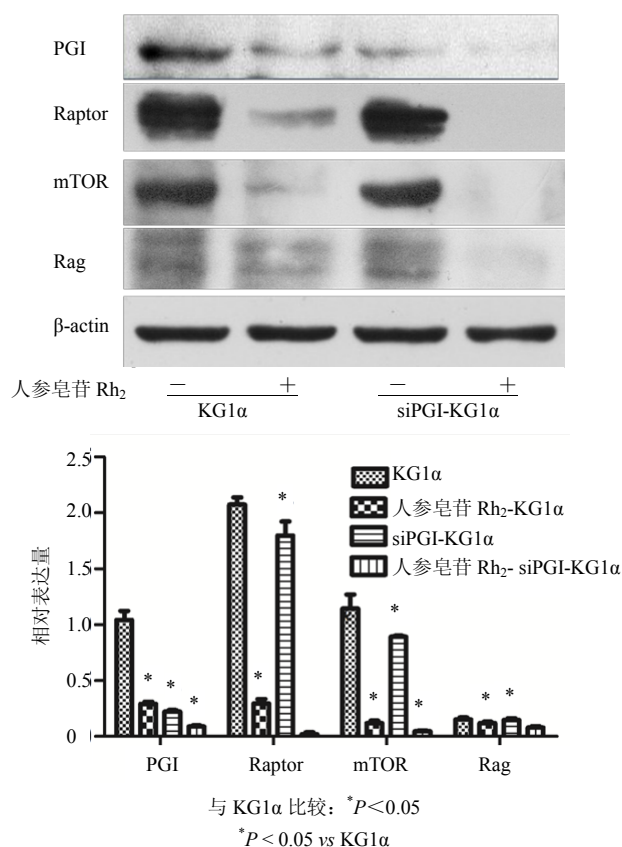


图5 下调 PGI/AMF 基因通过 mTOR 协同人参皂苷 Rh₂ 作用于 KG1α

Fig. 5 Effect on KG1α cells by down-regulation of PGI/AMF through synergy of mTOR with ginsenoside Rh₂

4 讨论

人参作为传统中药广泛应用于中医治疗中,近年来其有效成分用于各种肿瘤的预防治疗与愈后。人参中的有效成分对各种肿瘤具有抑制效果,如大肠癌、胃癌、肝癌、胰腺癌等^[6-7]。人参的有效成分

多样,其中人参皂苷 Rh₂ 具有显著的抗肿瘤效果^[3,8]。同时在肿瘤的发展中,PGI/AMF 对肿瘤的发生、发展、转移都起着重要作用。PGI 在细胞内作为一种糖酵解酶参与细胞代谢,同时当其分泌到细胞外时作为一种细胞因子参与肿瘤的转移与侵袭^[2,9-10]。据报道,PGI/AMF 可促进肿瘤细胞的增殖并且增强对压力应激凋亡的耐受力以利于肿瘤细胞的生长^[11-12]。PGI/AMF 在肿瘤中呈高表达^[13-14],通过课题组前期筛查发现在白血病细胞 K562、HL60、KG1α 中 PGI 也呈现高表达,其中 KG1α 表达最高^[15],因此本实验通过下调 PGI/AMF 基因表达来研究人参皂苷 Rh₂ 对白血病的疗效及相关机制。

人参皂苷 Rh₂ 对白血病 KG1α 细胞株有明显的抑制效果,低浓度作用使细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期,阻滞细胞生长。在高浓度时,其对细胞具有细胞毒性作用,使细胞凋亡,同时同浓度人参皂苷 Rh₂ 的作用下,下调 PGI/AMF 后细胞凋亡程度更加明显,表明 PGI/AMF 可增加人参皂苷 Rh₂ 对 KG1α 的敏感性。上调 PGI/AMF 的表达可增加肿瘤细胞凋亡耐受性^[16],抑制凋亡启动蛋白 Apaf-1 和 caspase-9 的表达,从而激活 PI3K 和 MAPK 引起丝裂霉素途径的凋亡耐受^[17]。PGI/AMF 的异常表达诱导 PI3K/AKT 通路的激活,AKT 活化引起肿瘤发展、侵袭、抗凋亡^[18],PGI/AMF 可作为肿瘤侵袭性的指标。AKT 通过 mTOR 和 p70S6 激酶途径发挥调节细胞生长的作用,同时也通过直接作用于 CDK 抑制子 p21 和 p27 及间接影响 cyclinD1 和 p53,调节细胞周期和增殖。本实验表明,下调 PGI/AMF 通过减少 PI3K/AKT 通路下游 Erk1/2、Raptor 的表达,从而下调 mTORC1 的表达调节细胞生长。

人哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸激酶,呈现两种截然不同效果的复合物 mTORC1 和 mTORC2。其中 mTORC1 与生长因子、营养素和能量相关的多种信号通路相关,参与有利条件下或压力应激下的分解代谢相关的细胞生长;mTORC2 通过激活 Akt 促进细胞的生存,通过激活 PKCα 调节细胞骨架蛋白动力学,通过 SGK1 磷酸化调节细胞的转运和生长。mTOR 作为维持体内平衡及细胞生长的 ATP 和氨基酸传感器^[19-20],在肿瘤、心血管疾病和代谢障碍性疾病等中异常表达。因此,mTOR 被认为是抗肿瘤治疗中的一个潜在靶点^[21]。PRAS40 被认为 Akt 的第 2 个基因参与 mTORC1 的调节,在 mTORC1 信号通路中起负反馈

调节作用^[22-23]。Raptor 作为 mTOR 的结合底物, 包括 4E-BP1 和 p70 S60 激酶, 参与 mTOR 的磷酸化。同时在低 ATP 的应激下, Raptor 作为 AMPK 的直接底物, 在丝氨酸 722 和 792 位点被 AMPK 激活。此磷酸化对抑制 Raptor 所结合的复合物 mTORC1 是必不可少的, 同时引起细胞周期阻滞^[24]。Raptor 作为一个关键位点调控与细胞周期相关的能源代谢。当下调 PGI 之后, 细胞糖酵解通路能量代谢受到影响, 使 Raptor 的磷酸化增强, 使 Raptor 表达降低, 从而抑制 mTORC1 复合物的形成, 影响细胞增殖。人参皂苷 Rh₂ 作用于人白血病 KG1 α 细胞后, 通过调节 Akt 通路相关蛋白 mTOR、Erk、JNK、Akt 的表达引起细胞周期阻滞, 抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡的发生。

总之, 人参皂苷 Rh₂ 抑制 KG1 α 细胞的增殖, 促进细胞凋亡的发生, 下调 PGI/AMF 抑制细胞增殖, 并促使 KG1 α 细胞对人参皂苷 Rh₂ 更加敏感。人参皂苷 Rh₂ 可能是通过 PGI/AMF 介导的 Akt/mTOR 途径对人白血病 KG1 α 发挥作用。

参考文献

- [1] Funasaka T, Hogan V, Raz A. Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor mediates epithelial and mesenchymal phenotype conversions in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(13): 5349-5356.
- [2] Niinaka Y, Harada K, Fujimuro M, et al. Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal-to-epithelial transition and suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9483-9493.
- [3] Chung K S, Cho S H, Shin J S, et al. Ginsenoside Rh₂ induces cell cycle arrest and differentiation in human leukemia cells by upregulating TGF- β expression [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(2): 331-340.
- [4] 程 慧, 宋新波, 张丽娟. 人参皂苷 Rg₃ 与 Rh₂ 的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(4): 307-311.
- [5] Sun C P, Gao W P, Zhao B Z, et al. Optimization for preparation of lemon-catalyzed ginsenoside Rg₃ by response surface method [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(3): 217-223.
- [6] Wang W, Wang H, Rayburn E R, et al. 20 (S)-25-methoxydammarane-3 β , 12 β , 20-triol, a novel natural product for prostate cancer therapy: activity *in vitro* and *in vivo* and mechanisms of action [J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(4): 792-802.
- [7] Tang X P, Tang G D, Fang C Y, et al. Effects of ginsenoside Rh₂ on growth and migration of pancreatic cancer cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(10): 1582-1592.
- [8] Cheng C C, Yang S M, Huang C Y, et al. Molecular mechanisms of ginsenoside Rh₂-mediated G1 growth arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 55(6): 531-540.
- [9] Shih W L, Yu F L, Chang C D, et al. Suppression of AMF/PGI-mediated tumorigenic activities by ursolic acid in cultured hepatoma cells and in a mouse model [J]. *Mol Carcinog*, 2012, 52(10): 800-812.
- [10] Fu M, Li L, Albrecht T, et al. Autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase regulates ER stress and cell death through control of ER calcium release [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(6): 1057-1070.
- [11] Haga A, Funasaka T, Niinaka Y, et al. Autocrine motility factor signaling induces tumor apoptotic resistance by regulations Apaf-1 and Caspase-9 apoptosome expression [J]. *Int J Cancer*, 2003, 107(5): 707-714.
- [12] Tsutsumi S, Yanagawa T, Shimura T, et al. Regulation of cell proliferation by autocrine motility factor/ phosphoglucose isomerase signaling [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(34): 32165-32172.
- [13] Funasaka T, Hu H, Yanagawa T, et al. Down-regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor results in mesenchymal-to-epithelial transition of human lung fibrosarcoma cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9): 4236-4243.
- [14] Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(12): 2153-2160.
- [15] 赵 亮, 李 静, 魏 强, 等. 人 PGI 基因 siRNA 慢病毒质粒的构建及对白血病细胞增殖的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(1): 20-23.
- [16] Tsutsumi S, Hogan V, Nabi I R, et al. Overexpression of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase induces transformation and survival of NIH-3T3 fibroblasts [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(1): 242-249.
- [17] Yanagawa T, Funasaka T, Tsutsumi S, et al. Novel roles of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase in tumor malignancy [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2004, 11(4): 749-759.
- [18] Nicholson K M, Anderson N G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy [J]. *Cell Signal*, 2002, 14(5): 381-395.
- [19] Dennis P B, Jaeschke A, Saitoh M, et al. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor [J]. *Science*, 2001, 294(5544): 1102-1105.
- [20] Gingras A C, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(7): 807-826.
- [21] Huang S, Houghton P J. Targeting mTOR signaling for cancer therapy [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3(4): 371-377.
- [22] Sancak Y, Thoreen C C, Peterson T R, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase [J]. *Mol Cell*, 2007, 25(6): 903-915.
- [23] Vander Haar E, Lee S I, Bandhakavi S, et al. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40 [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(3): 316-323.
- [24] Gwinn D M, Shackelford D B, Egan D F, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(2): 214-226.